



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101946179 B

(45) 授权公告日 2014.08.13

- (21) 申请号 200780102326.3 CN 1414971 A, 2003.04.30, 全文.
- (22) 申请日 2007.12.19 CN 1715923 A, 2006.01.04, 全文.
- (85) PCT国际申请进入国家阶段日 2010.08.13 US 2004/0102429 A1, 2004.05.27, 全文.
- (86) PCT国际申请的申请数据 2007.12.19 US 5489668 A, 1996.02.06, 全文.
- (87) PCT国际申请的公布数据 2009.06.25 FDA U.S..Premarket Notification ARCHITECT Sirolimus. 《510(k) Clearances K070822》. 美国食品和药物管理局, 2007, 1-6.
- (73) 专利权人 雅培制药有限公司 审查员 胡晓佳  
地址 美国伊利诺伊州
- (72) 发明人 F·C·格勒尼耶 R·F·沃克曼  
H·N·赛德 S·阿利
- (74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001  
代理人 权陆军 郭文洁
- (51) Int. Cl. G01N 33/53 (2006.01)
- (56) 对比文件 CN 1331603 A, 2002.01.16, 全文.

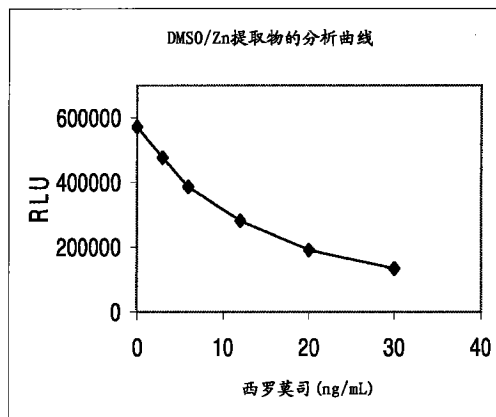
权利要求书2页 说明书18页 附图3页

(54) 发明名称

用于免疫分析的免疫抑制剂药物提取试剂

(57) 摘要

一种用于从血液样品提取免疫抑制剂药物, 例如西罗莫司、他克莫司或环孢霉素, 而产生具有低蒸气压和与免疫分析成分相容的测试样品提取物, 的改进的提取试剂组合和方法。本发明的试剂组合物包含二甲亚砜 (DMSO), 至少一种二价金属盐和水。这些组合的每一种的使用所产生的样品提取物具有低蒸气压, 并且与免疫化学分析是相容的。



1. 一种用于人类血液样品中免疫抑制剂药物的浓度的评估的方法,包括用包含二甲亚砷、选自乙二醇、丙二醇、二醇类似物和其混合物的二醇、至少一种二价金属盐和水提取试剂组合物接触人类血液样品,其中在所述提取试剂组合物中二甲亚砷的浓度按照体积是提取试剂组合物的至少约 50%,所述二醇的浓度按照体积计是提取试剂组合物的至少约 18%,且所述二价金属盐浓度是至少 5mM,其中所述提取试剂组合物具有在 20 摄氏度和标准大气压下低于水蒸气压的蒸气压。

2. 权利要求 1 的方法,进一步包含从任何产生的上清液相中分离产自所述人类血液样品与所述提取试剂组合物的接触的任何固相,并分析所述上清液相的免疫抑制剂药物。

3. 权利要求 1 的方法,其中所述免疫抑制剂药物选自由西罗莫司、他克莫司、依维莫司、zotarolimus、环孢霉素或其类似物构成的组。

4. 权利要求 1 到 3 的任一项的方法,其中所述二价金属盐包含硫酸锌、醋酸锌、硝酸锌、氯化锌、硫酸镉、硫酸铜或两种或更多种这些金属盐的混合物。

5. 权利要求 1 到 3 的任一项的方法,其中所述提取试剂组合物在至少约 30 摄氏度的温度下与血液样品接触。

6. 一种用于从血液样品提取免疫抑制剂药物的提取试剂组合物,包含二甲亚砷、选自乙二醇、丙二醇、二醇类似物和其混合物的二醇、至少一种二价金属盐和水,其中在所述提取试剂组合物中二甲亚砷的浓度按照体积是提取试剂组合物的至少约 50%,所述二醇的浓度按照体积计是提取试剂组合物的至少约 18%,且所述二价金属盐浓度是至少 5mM,其中所述提取试剂组合物具有在 20 摄氏度和标准大气压下低于水蒸气压的蒸气压。

7. 权利要求 6 的提取试剂组合物,其中所述提取试剂组合物包含选自由硫酸锌、醋酸锌、硝酸锌、氯化锌、硫酸镉、硫酸铜或两种或更多种这些金属盐的混合物构成的组的二价金属盐。

8. 权利要求 6 的提取试剂组合物,其中所述提取试剂组合物包含硫酸锌。

9. 权利要求 6 的提取试剂组合物,其中所述提取试剂组合物包含醋酸锌。

10. 一种用于人类血液样品中免疫抑制剂药物的浓度的评估的方法,包括用包含二甲亚砷、选自乙二醇、丙二醇、二醇类似物和其混合物的二醇、至少一种二价金属盐和水提取试剂组合物接触人类血液样品,来产生固相和上清液相,分离所述上清液相,以及通过免疫分析来分析所述上清液相以确定免疫抑制剂药物的浓度,其中在所述提取试剂组合物中二甲亚砷的浓度按照体积是提取试剂组合物的至少约 50%,所述二醇的浓度按照体积计是提取试剂组合物的至少约 18%,且所述二价金属盐浓度是至少 5mM,其中所述提取试剂组合物具有在 20 摄氏度和标准大气压下低于水蒸气压的蒸气压。

11. 权利要求 10 的方法,其中所述免疫抑制剂药物选自由西罗莫司、他克莫司、依维莫司、zotarolimus、环孢霉素或其类似物构成的组。

12. 权利要求 10 或 11 的方法,其中所述二价金属盐包含硫酸锌、醋酸锌、硝酸锌、氯化锌、硫酸镉、硫酸铜或两种或更多种这些金属盐的混合物。

13. 权利要求 10 或 11 的方法,其中所述提取试剂组合物在至少约 30 摄氏度的温度下与血液样品接触。

14. 一种包含独立的容器的测试试剂盒,所述容器各自含有成分,所述成分选自 (a) 能够特异性结合至少一种免疫抑制剂药物的至少一种抗体或蛋白质,所述免疫抑制剂药物选

自由西罗莫司、他克莫司、依维莫司、zotarolimus 和环孢霉素构成的组；和 (b) 包含二甲亚砷、选自乙二醇、丙二醇、二醇类似物和其混合物的二醇、至少一种二价金属盐和水提取试剂组合物；其中在所述提取试剂组合物中二甲亚砷的浓度按照体积是提取试剂组合物的至少约 50%，所述二醇的浓度按照体积计是提取试剂组合物的至少约 18%，且所述二价金属盐浓度是至少 5mM，其中所述提取试剂组合物具有在 20 摄氏度和标准大气压下低于水蒸气压的蒸气压。

15. 权利要求 14 的测试试剂盒，进一步包含含有对照组合物的容器，所述对照组合物包含选自自由西罗莫司、他克莫司、依维莫司、zotarolimus 和环孢霉素构成的组的至少一种免疫抑制剂药物。

16. 权利要求 14 或 15 的测试试剂盒，其中所述二价金属盐包含硫酸锌、醋酸锌、硝酸锌、氯化锌、硫酸镉或硫酸铜。

17. 一种包含独立的容器的测试试剂盒，所述容器各自含有成分，所述成分选自 (a) 能够特异性结合至少一种免疫抑制剂药物的至少一种抗体或蛋白质，所述免疫抑制剂药物选自自由西罗莫司、他克莫司、依维莫司和环孢霉素构成的组；和 (b) 提取试剂组合物，其包含按照体积的所述提取试剂组合物的至少约 50% 的二甲亚砷，按照体积的所述提取试剂组合物的约 30% - 33% 的乙二醇、丙二醇或其混合物，水，和至少 5mM 的浓度的硫酸锌；和包含至少一种免疫抑制剂药物的对照组合物，所述免疫抑制剂药物选自自由西罗莫司、他克莫司、依维莫司、zotarolimus 和环孢霉素构成的组。

18. 权利要求 17 的测试试剂盒，其中所述测试试剂盒包含西罗莫司。

## 用于免疫分析的免疫抑制剂药物提取试剂

### 技术领域

[0001] 本发明涉及诊断性免疫分析,来测定患者血液样品中的免疫抑制剂药物的浓度水平,特别地,涉及改进的免疫抑制剂药物提取试剂组合物的用途。

[0002] 背景

[0003] 临床上感兴趣的许多被分析物被细胞摄取,或变为与测试样品的一种或更多种其他成分一起复合。因而,为了获得样品中存在的被分析物数量的精确测量,优选的是在一定条件下处理样品和/或进行分析,从而所述被分析物从所述细胞或其他成分上释放用于在分析中检测。

[0004] 例如,免疫抑制剂药物,如西罗莫司(也称为雷帕霉素)、他克莫司、依维莫司、temtorolimus 和环孢霉素对于人类中移植手术后的器官或组织排斥、移植物抗宿主疾病和自体免疫疾病的治疗是有效的。在免疫抑制剂药物治疗期间,监测免疫抑制剂的血液浓度水平是临床护理的重要方面,因为不足的药物水平导致移植物(器官或组织)排斥,过多的水平导致非期望的副作用和毒性。因而,测量免疫抑制剂的血液水平,从而药物剂量可以被调节,以将药物水平维持在合适的浓度。用于免疫抑制剂血液水平的测定的诊断性分析因而具有广泛的临床应用。

[0005] 首先,免疫抑制剂必需从患者样品的其他成分中提取和分离。患者样品中的免疫抑制剂药物的主体,以与各种“载体”分子例如结合蛋白的复合物存在。西罗莫司、他克莫司和环孢霉素主要在患者样本的红血细胞中发现,并与特定的结合蛋白缔合,他克莫司和西罗莫司为FKBP,环孢霉素为亲环素(cyclophilin)。为了确保样本中总药物浓度的精确测量,结合到结合蛋白的药物优选地在定量之前释放。在从结合蛋白提取之后,药物可以按许多不同的方式测量,包括,利用吸光度的免疫分析或色谱,或质谱检测。

[0006] 西罗莫司从血液中它的结合蛋白的提取通常通过用有机溶剂,例如,乙腈、甲醇或二乙醚处理来实现。这些溶剂使结合蛋白变性并释放所述药物。然而当随后使用免疫分析来检测释放的药物时,有机溶剂的使用可能是有问题的,因为,将使结合蛋白快速和完全地变性的大多数有机溶剂与免疫分析不是相容的。它们要么太苛刻,要么它们产生双相的样品。甲醇一般被用于在免疫分析之前从血液样本提取西罗莫司、他克莫司或环孢霉素。然而,必需实现小心的平衡,从而甲醇浓度足以从结合蛋白释放药物,但是又不过大而干扰随后的免疫分析。甲醇和其他一般使用的有机溶剂的利用产生了另外的难题,因为这些溶剂具有比水更高的蒸气压。结果,含有免疫抑制剂药物的提取上清液快速地蒸发,这导致药物浓度的测量方面的不精确。广泛使用的甲醇或乙腈溶剂还产生了实验室的操作和处理问题。

[0007] 免疫抑制剂药物的免疫分析是以多种形式可获得的,但是都利用了抗体或结合蛋白(例如,FKBP)与免疫抑制剂药物的结合。通常使用的免疫分析是如下分析,其涉及第一抗体与免疫抑制剂的结合,以及标记的免疫抑制剂(例如,吡啶鎓-西罗莫司)与其余自由的抗体结合位点的结合,随后通过标记物的检测来定量。这些免疫分析的有效性受到对所使用的免疫抑制剂的特定提取和变性溶剂的影响。

[0008] 本发明的目的是提供与免疫分析一起使用的改进的免疫抑制剂药物提取试剂组合物,其具有低蒸气压、与水可混合、足够的免疫抑制剂变性能力和与免疫分析试剂的相容性。这样的提取试剂组合物对非免疫分析方法(例如,色谱测定)也将是有益的,因为低蒸气压、足够的变性能力和水混溶性将使得这些方法容易使用。

[0009] 概述

[0010] 本发明提供了用于从血液样品提取免疫抑制剂药物,同时产生具有低蒸气压和与免疫分析成分相容的测试样品提取物的改进的提取试剂组合物和方法,所述免疫抑制剂药物例如,西罗莫司、他克莫司、依维莫司、temcolorimus、zotarolimus、环孢霉素或其类似物。本发明的试剂组合物包含二甲亚砜(DMSO),至少一种二价金属盐和水。本发明的优选的试剂组合物包含DMSO,以及硫酸锌、醋酸锌、硝酸锌、氯化锌、硫酸镉、硫酸铜,以及这些金属盐的两种或更多种的混合物中的至少一种。一种更优选的试剂组合物包含DMSO、金属盐和具有两个到六个碳原子的至少一种二醇,其优选的是乙二醇(EG)、丙二醇(PG),或EG和PG的混合物中的至少一种。虽然DMSO、EG和PG是在水中可混溶的以及是常规实验室使用的低蒸气压溶剂,它们没有被用作蛋白质变性剂,反而常常作为稳定剂添加到蛋白质和细胞混合物。相比之下,我们发现,在存在二价金属阳离子的情况下,更高浓度下的DMSO可以充当有效的蛋白质变性剂来释放免疫抑制剂药物。此外,在存在二价阳离子的情况下,当与EG或PG混合时的较低浓度的DMSO也可以充当有效的蛋白质变性剂,虽然在独立使用时该溶剂的浓度不是致变性的。这些组合的每一种的使用所产生的测试样品提取物具有低蒸气压,并且是与免疫化学分析相容的。

[0011] 本发明还包括检测测试样品中免疫抑制剂药物的浓度水平的方法,包括步骤:(a)将包含DMSO、二价金属盐和水提取试剂组合物与测试样品组合来形成测试样品提取物;(b)将所述测试样品提取物与至少一种抗体或蛋白质组合来形成分析混合物,所述抗体或蛋白质对免疫抑制剂药物是免疫反应性的;(c)在适合于所述抗体和如果有的话、存在于样品中的所述免疫抑制剂药物之间形成复合物的条件下孵育所述分析混合物;和(d)检测形成的任何复合物的存在。步骤(d)中复合物的存在的检测可以利用其上附着了信号产生化合物的免疫抑制剂以结合到被分析物上的其余自由的抗体结合位点来进行。进一步的实施方式提供了步骤(d)中复合物的存在的检测利用可检测的抗体来进行,所述可检测的抗体结合步骤(c)中形成的复合物。

[0012] 本发明还包括用于分析免疫抑制剂药物的血液水平的试剂盒,其包含含有所述提取试剂组合物的容器,所述提取试剂组合物包含DMSO、至少一种二价金属盐和水,更优选的还包含乙二醇、丙二醇、或任何适合的二醇类似物,或其混合物。优选的,所述试剂盒进一步包含第二容器,其具有特异于所述免疫抑制剂药物的至少一种抗体或蛋白质。更优选的,所述试剂盒含有第三容器,所述第三容器含有包含免疫抑制剂药物的对照组合物,所述免疫抑制剂药物例如,选自由西罗莫司、他克莫司、依维莫司、zotarolimus、环孢霉素和其类似物构成的组的免疫抑制剂。

[0013] 本发明具有显著的能力来提供更高敏感性的免疫分析,用于测定西罗莫司、他克莫司、依维莫司、temcolorimus、zotarolimus和环孢霉素的血液浓度水平。本发明的提取试剂浓度容许药物水平的更精确的测量,同时为临床实验室提供了更容易的使用。

[0014] 附图的简要描述

[0015] 附图 1 显示了利用 DMSO 和硫酸锌对来自血液样品的西罗莫司的提取的实验结果。

[0016] 附图 2 显示了利用 DMSO 和变化数量的硫酸锌对来自血液样品的西罗莫司的提取的实验结果。

[0017] 附图 3 显示了利用 DMSO、EG 和硫酸锌对来自血液样品的西罗莫司的提取的实验结果。

[0018] 附图 4 显示了加热来自血液样品和本发明的提取试剂组合物的提取混合物的实验结果。

[0019] 附图 5 显示了来自现有技术的甲醇变性剂的使用和来自本发明的使用的样品提取物蒸发速率的比较。

[0020] 详细说明

[0021] I. 概述

[0022] 本发明包括提取试剂组合物,其对于来自血液样品的免疫抑制剂药物例如西罗莫司的提取和变性是有用的;利用本发明的提取试剂组合物定量免疫抑制剂药物水平的方法;以及包含本发明的提取试剂组合物的诊断试剂盒。本发明的优选的方法包括免疫分析,其利用免疫反应性特异性结合成分,例如,单克隆或多克隆抗体,或结合蛋白(例如,FKBP),用于与免疫抑制剂药物被分析物的复合物的形成。

[0023] 定义

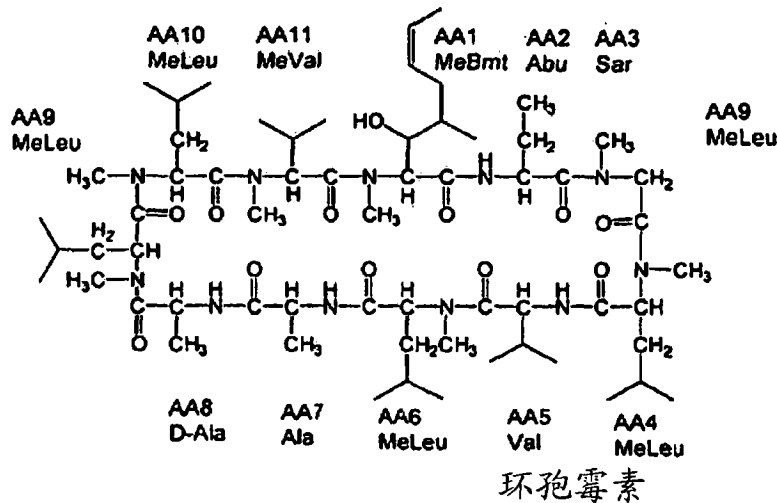
[0024] 除非另作说明,在权利要求和说明书中使用的术语按如下阐述的定义。

[0025] 如在此使用的,“免疫抑制剂药物”或“免疫抑制剂”是指基于小分子或抗体的治疗化合物,其与雷帕霉素(西罗莫司)或环孢霉素、也称为环孢霉素 A 具有相同的或相似的化学结构。任何已知的或以后开发的雷帕霉素或环孢霉素的类似物被认为是此处的免疫抑制剂。优选的免疫抑制剂包括西罗莫司、他克莫司、依维莫司、temsorolimus、zotarolimus 和环孢霉素。他克莫司和环孢霉素是 calcineurin 抑制物,其抑制免疫系统的 T 淋巴细胞通过细胞因子如白细胞介素 2 的抑制作用的早期活化。相比之下,西罗莫司、依维莫司和 zotarolimus 的主要靶点是雷帕霉素(mTOR),一种特定的细胞周期调节蛋白,的哺乳动物靶点。mTOR 的抑制作用导致细胞因子驱动的 T-淋巴细胞增殖的抑制。

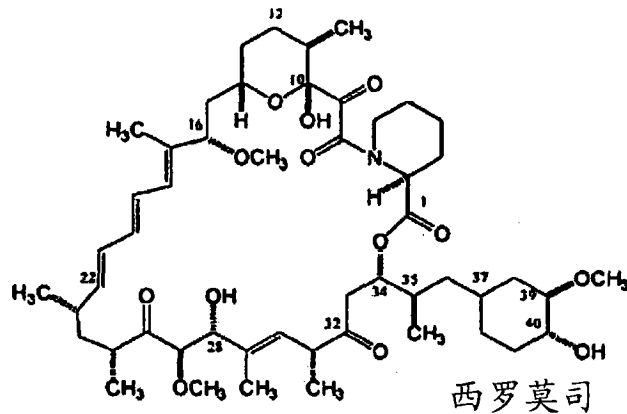
[0026] 环孢霉素的化学式在式 A 中。西罗莫司(雷帕霉素)的化学式在式 B 中。依维莫司(RAD)与西罗莫司的结构差异的化学式在式 C 中。

[0027]

A

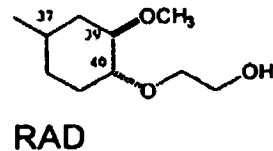


B



[0028]

C



[0029] 已经制备了环孢霉素的许多衍生物或类似物。本发明包括用于环孢霉素或任何它的类似物的提取试剂、提取方法、分析和分析试剂盒。提取试剂也在文献中作为裂解试剂被描述。

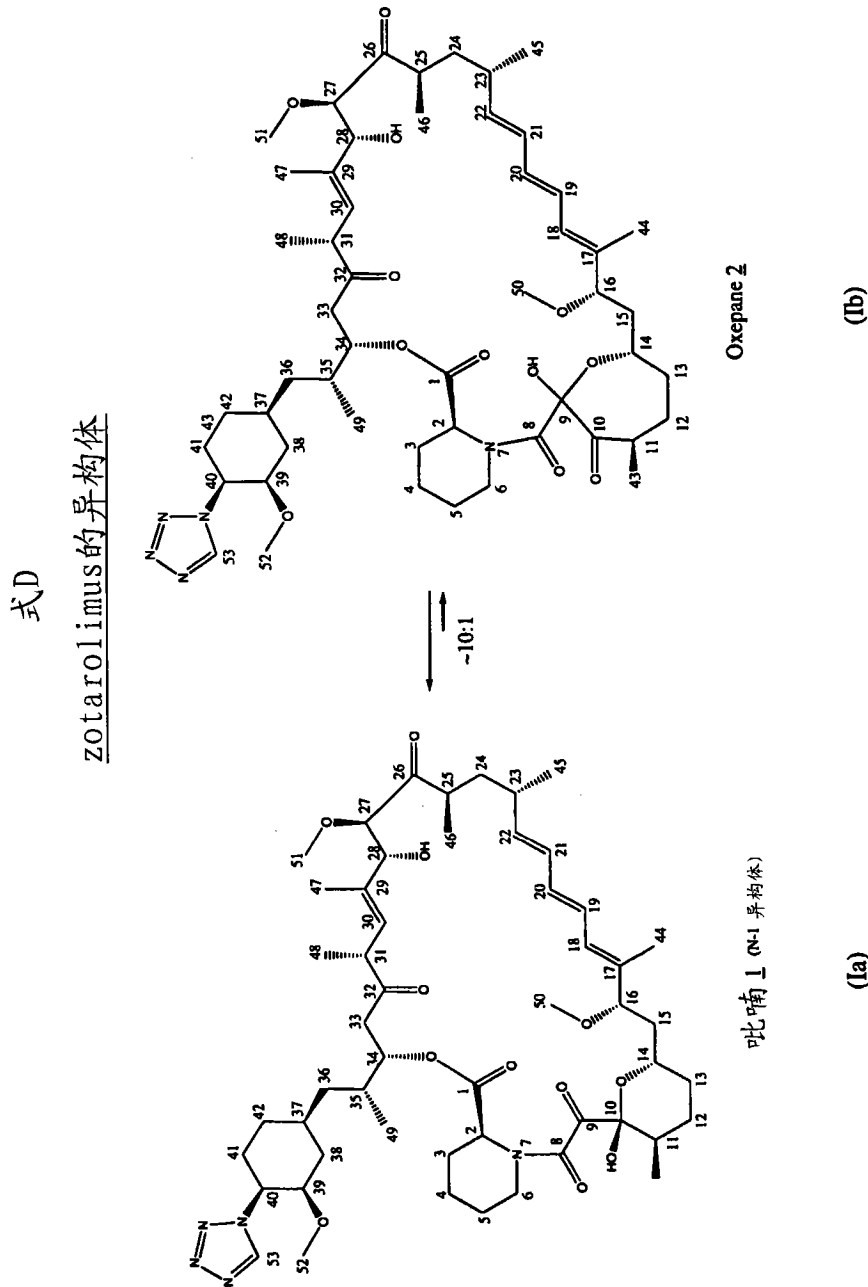
[0030] 已经制备了雷帕霉素的许多衍生物或类似物。例如,这些包括,雷帕霉素的单酯和二酯衍生物 (PCT 国际申请 W0 92/05179)、雷帕霉素的 27- 肟 (欧洲专利 EP 0 467606) ;雷帕霉素的 42- 氧代类似物 (美国专利 No. 5, 023, 262) ;二环的雷帕霉素 (美国专利 No. 5, 120, 725) ;雷帕霉素二聚体 (美国专利 No. 5, 120, 727) ;雷帕霉素的甲硅烷基醚 (美国专利 No. 5, 120, 842) ;以及芳香磺酸盐和氨基磺酸盐 (美国专利 No. 5, 177, 203) 的制品。雷帕霉素近来以它的天然存在的对应异构形式被合成 (K. C. Nicolaou et al., J. Am. Chem. Soc., 1993, 115, 4419-4420 ;S. L. Schreiber, J. Am. Chem. Soc., 1993, 115, 7906-7907 ;S. J. Danishefsky, J. Am. Chem. Soc., 1993, 115, 9345-9346。本发明包括用于雷帕霉素或任何它的类似物的提取试剂、提取方法、分析和分析试剂盒。

[0031] 雷帕霉素的另一种免疫抑制剂类似物是 FK-506, 也称为他克莫司, 其分离自

S. tsukubaensis 的菌株。FK-506 的化学式在欧洲专利 EP0 293 892 B1 中公开。FK-506 的类似物包括相关的天然产物 FR-900520 和 FR-900523, 其在 C-21 处在它们的烷基取代基上不同于 FK-506, 分离自 S. hygroscopicus yakushimnaensis。另一种类似物, 由 S. tsukubaensis 产生的 FR-900525, 与 FK-506 不同在于六氢吡啶羧酸部分被脯氨酸基团替换。本发明包括用于 FK-506 或任何它的类似物的提取试剂、提取方法、分析和分析试剂盒。Temsorolimus 是西罗莫司的另一种酯衍生物, 其可以用本发明来监测。

[0032] ABT-578[40-epi-(1-四唑基)-雷帕霉素], 当今作为 zotarolimus 更为了解的, 是来自雷帕霉素的半合成的大环内酯类三烯抗生素。Zotarolimus 的结构在式 D 中示出。

[0033]



[0034] 本发明包括用于 zotarolimus 或任何它的类似物的提取试剂、提取方法、分析和分析试剂盒。如在此对于免疫抑制剂药物使用的, 术语“结构上相似的”表明所述药物具有足够相似的结构, 从而所述药物竞争性地结合至少一种常见的结合配体 (例如, 结合蛋

白)。

[0035] 如在此使用的,“抗体”是指由一种或更多种多肽组成的蛋白质,所述多肽基本上由免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因的片段编码。这个术语包括多克隆抗体、单克隆抗体和其片段,以及从免疫球蛋白基因序列工程化的分子。公认的免疫球蛋白基因包括 kappa、lambda、alpha、gamma、delta、epsilon 和 mu 恒定区基因,以及无数的免疫球蛋白可变区基因。轻链被分类为 kappa 或 lambda。重链被分类为 gamma、mu、alpha、delta 或 epsilon,其转而定义了免疫球蛋白类型,分别为 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。

[0036] 已知典型的免疫球蛋白(抗体)结构单位包含四聚体。每个四聚体由两个相同的多肽链对组成,每个对具有一个“轻”链(约 25kD)和一个“重”链(约 50-70kD)。每个链的 N-末端划定了主要对抗原识别负责的约 100 到 110 个或更多个氨基酸的可变区。术语“可变轻链(VL)”和“可变重链(VH)”分别是指这些轻链和重链。

[0037] 抗体作为完整的免疫球蛋白,或作为由各种肽酶消化产生的许多良好表征的片段而存在。因而,例如,胃蛋白酶在绞链区中的二硫键下消化抗体来产生 F(ab')<sub>2</sub>,一种 Fab 的二聚体,其本身是通过二硫键连接到 VH-CH1 的轻链。F(ab')<sub>2</sub> 可以在温和条件还原来打断绞链区中的二硫键,从而将 (Fab')<sub>2</sub> 二聚体转变成 Fab' 单体。Fab' 单体基本上是具有绞链区的部分的 Fab(其他抗体片段的更多详细描述参见, *Fundamental Immunology*, W. E. Paul, ed., Raven Press, N. Y. (1993))。虽然就完整抗体的消化而言划定了各种抗体片段,熟练技术人员将理解,这样的 Fab' 片段可以化学地或通过利用重组 DNA 方法来从头合成。

[0038] 因而,在此使用的术语“抗体”还包括通过完整抗体的修饰产生的,或利用重组 DNA 方法从头合成的抗体片段。术语“抗体”还包括单链抗体(作为单个多肽链存在的抗体),更优选的单链 Fv 抗体(sFv 或 scFv),其中可变的重链和可变轻链结合在一起(直接地或通过肽接头)来形成连续的多肽。单链 Fv 抗体是共价连接的 VH-VL 异二聚体,其可以从包括 VH- 和 VL- 编码序列的核酸表达,所述 VH- 和 VL- 编码序列直接地或通过肽编码接头来连接(Huston, et al. (1988) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 85 :5879-5883)。虽然 VH 和 VL 作为单独的多肽链相互连接, VH 和 VL 结构域非共价地缔合。scFv 抗体和许多其他结构将天然聚集的、但是化学上独立的轻和重多肽链从抗体 V 区转化成为如下分子,所述分子折叠成与抗原结合位点的结构基本上类似的三维结构,是本领域技术人员公知的(参见,例如,美国专利 Nos. 5, 091, 513, 5, 132, 405 和 4, 956, 778)。

[0039] 如在此使用的,“被分析物”是指要检测的物质,其被怀疑存在于测试样品中。被分析物可以是任何物质,所述物质存在天然存在的特异性结合配体,或可以制备它的特异性结合配体。因而,被分析物是可以在分析中结合一种或更多种特异性结合配体的物质。

[0040] 如在此使用的,“结合配体”是结合对的成员,即,一对分子,其中分子之一与第二分子结合。特异性结合的结合配体被称为“特异性结合配体”。除了免疫分析中通常使用的抗原和抗体结合配体之外,其他特异性结合配体可以包括生物素和抗生物素蛋白、碳水化合物和凝集素、互补核苷酸序列、效应物和受体分子、辅助因子和酶、酶抑制物和酶,等等。免疫反应性特异性结合配体包括抗原、抗原片段、抗体和抗体片段、单克隆和多克隆的、和其复合物,包括通过重组 DNA 方法形成的那些。

[0041] 术语“特异性结合”在此定义为结合配体与另一个(例如,多肽和配体(被分析

物)、两个多肽、多肽和核酸分子、或两个核酸分子)在特异性位点处的优先结合。术语“特异性结合”表明,目标分子/序列的结合偏爱性(例如,亲和力)是非特异性目标分子(例如,缺乏特异性识别位点的随机产生的分子)的至少 2 倍、更优选的至少 5 倍、最优选的至少 10- 或 20- 倍。

[0042] 特异性结合免疫抑制剂药物的抗体被称为“特异于”该免疫抑制剂药物。

[0043] 术语“捕获试剂”在此使用是指结合被分析物、优选的特异性结合被分析物的结合配体。捕获试剂可以附着到固相上。如在此使用的,固相固定的捕获试剂与被分析物的结合形成“固相固定的复合物”。

[0044] 在此使用的术语“标记的检测试剂”是指结合配体,其结合被分析物,优选的特异性结合被分析物,并且被可检测标记物标记,或在分析中使用期间变为用可检测标记物标记的。

[0045] “可检测标记物”包括这样的部分,其是可检测的、或可以成为可检测的。

[0046] 如对于标记的检测试剂所使用的,“直接标记物”是这样的可检测标记物,其通过任何方式附着到检测试剂上。

[0047] 如对于标记的检测试剂所使用的,“间接标记物”是特异性结合检测试剂的可检测标记物。因而,间接标记物包括这样的部分,其是检测试剂的部分的特异性结合配体。生物素和抗生物素蛋白是被采用的这样的部分的实例,例如,通过用标记的抗生物素蛋白接触生物素化的抗体来产生间接标记的抗体。

[0048] 如在此使用的,术语“指示物试剂”是指任何试剂,其与标记物接触来产生可检测信号。因而,例如,在常规的酶标记中,用酶标记的抗体可以与底物(指示物试剂)接触来产生可检测信号,例如有色的反应产物。

[0049] 术语“测试样品”是指作为免疫抑制剂药物被分析物的来源的动物身体的成分、组织或流体。这些成分、组织和流体包括人类和动物体流体,例如,全血、血清、血浆、滑液、脑脊液、尿液、淋巴液,和呼吸道、肠道和泌尿生殖道的各种外分泌物,泪液、唾液、奶、白细胞、骨髓瘤等等;生物流体,例如,细胞培养物上清液;固定的组织样本;固定的细胞样本。优选的,所述测试样品是人类外周血样品。

[0050] II. 提取试剂组合物

[0051] 本发明的改善的提取试剂组合物包括二甲亚砜(DMSO)、至少一种二价金属盐和水。本发明的优选的试剂组合物包括 DMSO,以及硫酸锌、醋酸锌、硝酸锌、氯化锌、硫酸镉和硫酸铜的至少一种。更优选的试剂组合物包括 DMSO,乙二醇和丙二醇的至少一种、或任何适合的二醇类似物,以及金属盐。优选的本发明的组合物具有低于水蒸气压的蒸气压,根据在 20 摄氏度和一个大气压下测量的,并且是与水可混溶的。

[0052] 不从本发明的试剂组合物中沉淀的任何适合的二价金属盐可以被使用,锌的盐是优选的。示范性的适合的二价金属包括锌、铜和镉。申请人没有穷举性地测试所有可能的二价金属阳离子,但是已经确定了硫酸锡和硫酸锰在测试的浓度下是不适合的。金属盐的阴离子可以是任何适合的阴离子,包括,卤化物、硝酸盐、硫酸盐、硫化物、磷酸盐和乙酸盐。优选的金属盐是硫酸锌。

[0053] 当不与 EG 或 PG 一起使用时,在所述提取试剂组合物中的 DMSO 浓度按照体积是提取试剂组合物的至少约 50%,优选的至少约 80%,最高达约 95%。金属盐浓度是至少约

5mM,可以使用最高达约 400mM 的浓度。锌盐的优选的浓度范围是约 30 到约 75mM。高盐浓度的使用,例如,高于约 75mM,可能需要在随后的分析步骤中使用螯合化合物,例如乙二胺四乙酸来除去过量的金属。提取试剂组合物通过任何适合的混合方法来制备,以充分混合 DMSO 与水并溶解金属盐。

[0054] 申请人发现,当 EG 和 PG 被包括在提取试剂组合物中,则更低的 DMSO 的浓度是更有效的。在这些优选的组合物中,EG、PG 或其混合物以按照体积的提取试剂组合物的至少约 18%、优选的约 25%到约 33%的浓度存在,DMSO 以按照体积的提取试剂组合物的至少约 50%的浓度存在。

#### [0055] II. 测试样品提取物的形成

[0056] 本发明的方法一般对来自动物、优选的哺乳动物、更优选的人类的测试样品进行。

[0057] 本发明的方法可以使用可能含有感兴趣的被分析物(例如,免疫抑制剂药物)的任何样品进行,例如血液样品。

[0058] 通过任何混合技术,在任何期望的温度使任何选择的数量的血液样品与提取试剂组合物接触,来形成测试样品提取物。一般地,约 100  $\mu$  L 到约 600  $\mu$  L 的血液样品与约 200  $\mu$  L 到约 1200  $\mu$  L 的提取试剂组合物混合达到约五分钟。优选的,免疫抑制剂的提取通过混合 150  $\mu$  L 的血液样品和 300  $\mu$  L 组合物,并大力旋涡 5-10 秒来完成。申请人优选通过加热提取混合物到高于室温、处在约 30 摄氏度到约 50 摄氏度之间的温度下约五分钟到约六十分钟来进行提取。在混合之后,产生的悬浮液在适合的转速下离心适合的时间来产生上清液相和沉淀物相。优选的,所述混合物在 13,000rpm 离心 5 分钟来团化沉淀物。在离心之后,使用任何适合的方法分离上清液。然后利用任何适合的技术,包括色谱和免疫分析,来分析上清液的免疫抑制剂。

#### [0059] III. 免疫分析

[0060] 在另一个方面,本发明涉及免疫分析,其可以用于测试样品中免疫抑制剂药物的定性鉴定和/或定量。本发明因而包括检测测试样品中免疫抑制剂药物的浓度水平的方法,包括步骤:(a) 将包含 DMSO、至少一种二价金属盐的提取试剂组合物与所述测试样品和水组合来形成测试样品提取物;(b) 将能够结合免疫抑制剂药物的至少一种抗体或蛋白质与所述测试样品提取物组合来形成测试混合物;(c) 在适合于所述抗体和如果有的话、存在于样品中并与所述抗体为免疫反应性的所述免疫抑制剂药物之间形成复合物的条件下孵育所述测试混合物;和(d) 检测所形成的任何复合物的存在。本发明的免疫分析可以利用本领域已知的任何形式来进行,例如,但不限于,夹心形式、竞争性抑制形式(包括正或反的竞争性抑制分析),或荧光偏振形式。发明人发现了,在使用本发明的提取试剂组合物之后,可以进行极好的竞争性抑制免疫分析。

[0061] 在用于测试样品中免疫抑制剂药物的定性或定量检测的免疫分析中,结合免疫抑制剂药物的至少一种抗体或蛋白质与怀疑含有或已知含有免疫抑制剂药物的至少一种测试样品或测试样品提取物接触,来形成抗体-药物或蛋白质-药物免疫复合物。结合特定免疫抑制剂的任何适合的抗体或结合蛋白(例如,FKBP)可以用于本发明的免疫分析。西罗莫司、他克莫司、zotarolimus、环孢霉素和依维莫司的每一种的抗体是本领域已知的,和/或是商业上可获得的,任何这些都可以被使用。优选的是使用作为用于测量西罗莫司的 Abbott 实验室的商业上可获得的 IMx <sup>®</sup>西罗莫司分析的成分的单克隆抗体(Abbott

Laboratories, Abbott Park, IL)、或 Abbott 实验室销售的任何其他西罗莫司分析试剂盒(例如,用于在不同的商业自动化平台上使用的)。

[0062] 产生特异于免疫抑制剂药物例如西罗莫司的抗体的示范性的方案可以如下产生。雌性 Rbf/Dnj 小鼠施用三个每月一次的西罗莫司 -27-CMO- 破伤风类毒素免疫原的强化,随后在第 4 个月用西罗莫司 -42-HS- 破伤风类毒素制品免疫。七个月后,通过在融合之前 3 天使用西罗莫司 -27-CMO- 破伤风类毒素免疫原,脾内的融合前强化被施用给动物。然后分离脾脏 B 细胞,在与 SP2/0 骨髓瘤的标准聚乙二醇 (PEG) 融合中使用。汇合的培养物在 10-14 天后在微量滴定 EIA 中筛选抗西罗莫司活性,然后,阳性培养物利用限制稀释克隆技术来克隆。产生的克隆被分离,并在 IMDM w/FBS (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) 组织培养基中扩大,分泌的抗体利用蛋白 A 来亲和纯化。如上所述的优选的西罗莫司抗体对于在西罗莫司、依维莫司和 zotarolimus 的免疫分析中使用也是有效的。

[0063] 用于他克莫司的免疫分析的示范性的优选的抗体在 M. Kobayashi et al., " A Highly Sensitive Method to Assay FK-506 Levels in Plasma " , at pp 23-29 of " FK-506 A Potential Breakthrough in Immunosuppression " , A Transplantation Proceedings Reprint, Supplement 6, Vol. XIX, October, 1987, Editors T. Starzl, L. Makowka and S. Todo, published by Grune & Stratton, Inc., Philadelphia, PA. 中描述了。

[0064] 用于环孢菌素的免疫分析的示范性的优选的抗体是作为用于测量环孢霉素的 Abbott 实验室的商业上可获得的 AxSYM<sup>®</sup> 环孢霉素分析的成分的单克隆抗体。

[0065] 抗体 - 药物免疫复合物然后可以使用任何适合的技术来检测。例如,抗体可以用可检测标记物标记,来检测抗体 - 药物复合物的存在。可以使用任何适合的标记物。特定标记物的选择不是关键的,但是选择的标记物必需能够自己、或与一种或更多种另外的物质一起产生可检测信号。

[0066] 有用的可检测标记物、它们与抗体或与其他结合蛋白的附着以及用于其的检测技术是本领域已知的。可以使用本领域已知的任何可检测标记物。例如,可检测标记物可以是放射性标记,例如,<sup>3</sup>H、<sup>125</sup>I、<sup>35</sup>S、<sup>14</sup>C、<sup>32</sup>P、<sup>33</sup>P;酶标记物,例如,辣根过氧化物酶、碱性过氧化物酶、葡糖 -6- 磷酸脱氢酶,等等;化学发光标记物,例如,吖啶鎓 (acridinium) 衍生物、鲁米诺、异鲁米诺、硫酯、磺胺、phenanthridinium 酯,等等;荧光标记物,例如,荧光素 (5- 荧光素、6- 羧基荧光素、3' - 6- 羧基荧光素、5(6)- 羧基荧光素、6- 六氯 - 荧光素、6- 四氯荧光素、异硫氰酸荧光素,等等),罗丹明、藻胆蛋白、R- 藻红素、量子点 (硫化锌 - 加帽的硒化镉);测温标记物;或免疫 - 聚合酶链式反应标记物。对标记物、标记过程和标记物的检测的介绍可以在 Polak and Van Noorden, Introduction to Immunocytochemistry, 2<sup>nd</sup> ed., Springer Verlag, N. Y. (1997) 和在 Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemi (1996) 中找到,其是由 Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon 出版的组合的手册和目录,其中每一个通过引用合并在此。用于本发明的优选的标记物是化学发光标记物,例如,吖啶鎓 -9- 氨甲酰。其他细节可以在 Mattingly, P. G., and Adamczyk, M. (2002) Chemiluminescent N-sulfonylacridinium-9-carboxamides and their application in clinical assays, in Luminescence Biotechnology: Instruments and Applications (Dyke, K. V., Ed.) pp 77-105, CRC Press, Boca Raton 中找到。

[0067] 可检测标记物可以直接地或通过偶联剂结合到被分析物、被分析物类似物或抗体。可以使用的偶联剂的实例是EDAC(1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐),其可从Sigma-Aldrich(St. Louis, MO)商业上可获得。可以使用的其他偶联剂是本领域已知的。将可检测标记物结合到抗体的方法是本领域已知的。另外,许多可检测标记物可以购买或合成,它们已经含有促进可检测标记物与抗体的偶联的末端基团,例如,N10-(3-磺丙基)-N-(3-羧丙基)-吡啶鎓-9-氨甲酰,另外称为CPSP-吡啶鎓酯或N10-(3-磺丙基)-N-(3-磺丙基)-吡啶鎓-9-氨甲酰,或者称为SPSP-吡啶鎓酯。

[0068] 做为选择,结合免疫抑制剂并且含有可检测标记物的第二抗体可以添加到测试样品或测试样品提取物中,用于检测抗体-药物复合物的存在。任何适合的可检测标记物可以用于这个实施方式。

[0069] 本发明的免疫分析可以利用本领域已知的任何形式来进行,例如,但不限于,夹心形式、竞争性抑制形式(包括正或反的竞争性抑制分析),或荧光偏振形式。就分析免疫抑制剂药物而言描述了如下所述的示范性的形式。然而,如技术人员理解的,所描述的形式适合于任何被分析物。

[0070] 在用于免疫抑制剂的定量检测的免疫分析,例如,优选的夹心型形式中,采用至少两种抗体来分离和定量测试样品或测试样品提取物中的药物。更具体地,至少两种抗体结合到药物的不同的部分,形成被称为“夹心物”的免疫复合物。一般地,一种或更多种抗体可以用于捕获测试样品中的免疫抑制剂(这些抗体经常被称为“捕获”抗体(单种或复数种的)),一种或更多种抗体被用于将可检测的(即,可定量的)标记物结合到夹心物(这些抗体经常被称为“检测”抗体(单种或复数种的))。在夹心分析中,优选的是,结合药物的两种抗体不被分析中的任何其他抗体与它的相应结合位点的结合所削弱。换句话说,应当选择抗体,从而与怀疑含有免疫抑制剂的测试样品或测试样品提取物接触的一种或更多种第一抗体不结合由第二或随后的抗体所识别的所有或部分结合位点,而干扰所述一种或更多种第二检测抗体与所述药物结合的能力。在夹心分析中,所述抗体,优选的所述至少一种捕获抗体,以测试样品或测试样品提取物中预计的药物的最大数量的摩尔过量数量来使用。例如,可以使用约 $5\mu\text{g/mL}$ 到约 $1\text{mg/mL}$ 抗体每mL含固相的溶液。

[0071] 在一个实施方式中,所述至少一种第一捕获抗体可以结合到固相支持物,其促进第一抗体-药物复合物从测试样品中分离。在本发明的免疫分析中使用的固相支持物或“固相”不是关键的,可以由本领域技术人员选择。如在此使用的,固相或固相支持物,是指不溶的、或可以通过随后的反应变为不溶的任何材料。有用的固体相或固相支持物是本领域技术人员已知的,包括反应盘的壁或孔、试管、聚苯乙烯珠子、磁性珠子、硝化纤维条、膜、微粒,例如胶乳颗粒,绵羊(或其他动物)红细胞,和Duracytes<sup>®</sup>(Abbott Laboratories, Abbott Park, Ill的注册商标),其是通过丙酮醛和甲醛“固定”的红细胞,以及其他的。用于将肽固定在固体相上的适合的方法包括离子的、疏水性的、共价的相互作用,等等。可以选择固相的内在能力,来吸移和固定捕获试剂。做为选择,固相可以包括另外的受体,其具有吸移和固定所述捕获试剂的能力。其他受体可以包括带电的物质,其对于捕获试剂本身或契合到捕获试剂的带电物质是相反地带电的。对于再另一个可选方案,受体分子可以是任何特异性结合成员配体,其固定在(附着于)固相上,并且其具有通过特异性结合反应固定捕获试剂的能力。受体分子允许在分析的进行之前或分析的进行期间捕获试剂与固相材

料的间接结合。

[0072] 可以使用本领域已知的任何固相支持物,包括但不限于,由处于孔、试管或珠子形式的聚合材料制成的固相支持物。单种抗体(或复数种的抗体)可以通过吸附、通过利用化学偶联试剂的共价结合、或通过本领域已知的其他方式结合到固相支持物上,条件是这样的结合不影响抗体结合药物的能力。此外,如果需要,固相支持物可以被衍生来容许与抗体上的各种官能团的反应性。这样的衍生化需要利用某些偶联剂,例如,但不限于,顺丁烯二酸酐、N-羟基琥珀酰亚胺和 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺。

[0073] 处在本发明的范围内的是,固相也可以包含具有足够的多孔性的任何适合的多孔材料,以容许检测抗体的接近和适合的表面亲和力来结合抗原。微孔的结构一般是优选的,但是具有处于水合状态的凝胶结构的材料也可以使用。这样的有用的固相支持物包括但不限于硝化纤维素和尼龙。期待的是,此处描述的这样的多孔固体支持物优选地处于厚度约 0.01 到 0.5mm、优选的约 0.1mm 的片状的形式。孔大小可以在大的限度内变化,优选的从约 0.025 到 15 微米,特别是从约 0.15 到 15 微米。这样的支持物的表面可以通过化学过程来活化,其导致抗原或抗体对支持物的共价键合。然而,一般地,通过通过疏水性力吸附在多孔材料上获得抗原或抗体的不可逆的结合。

[0074] 在怀疑含有或含有免疫抑制剂的测试样品提取物与所述至少一种第一捕获抗体接触之后,孵育产生的混合物以容许第一捕获抗体(或多种抗体)-药物复合物的形成。孵育可以在任何适合的 pH 值下进行,包括约 4.5 到约 10.0 的 pH 值,在任何适合的温度下,包括约 2°C 到约 45°C,持续适合的时间,从至少约 1 分钟到约 18 小时,优选的约 4-20 分钟,最优选的约 17-19 分钟。

[0075] 在检测试剂的添加和标记的复合物的形成之后,复合物中的标记物的数量利用本领域已知的技术来定量。例如,如果使用酶标记物,标记的复合物与该标记物的底物反应,其产生可定量的反应,例如显色。如果标记物是放射性标记物,标记物利用闪烁计数器来定量。如果标记物是荧光标记物,通过用单色的光线(其被称为“激发波长”)刺激标记物,检测标记物响应于所述刺激发射的另一种颜色(其被称为“发射波长”)来定量标记物。如果标记物是化学发光标记物,视觉地或通过利用光度计、X 射线胶片、高速感光胶片、CCD 摄像机,等等,检测发射的光来定量标记物。一旦复合物中标记物的数量被定量,测试样品中药物的浓度可以通过使用标准曲线来确定,所述标准曲线已经利用例如已知浓度的免疫抑制剂药物的连续稀释来产生。除了使用药物的连续稀释物,标准曲线可以通过质谱法和通过本领域已知的其他技术重量分析地产生。

[0076] 在优选的正向竞争形式中,已知浓度的标记的药物或其类似物的等分量,被用于与测试样品中存在的药物竞争对抗体的结合。在正向竞争分析中,固定的抗体可以顺序地或同时地与测试样品和标记的药物或其药物类似物接触。药物或药物类似物可以用任何适合的可检测标记物,包括以上讨论的那些可检测标记物标记。在这种分析中,本发明的捕获抗体可以利用在此早先讨论的技术固定到固相支持物上。做为选择,捕获抗体可以偶联到抗体,例如抗物种抗体上,其已经被固定在固相支持物例如微粒上。

[0077] 标记的药物或药物类似物、测试样品提取物和抗体在一定条件下孵育,所述条件类似于上文关于夹心分析形式所描述的那些。然后产生两种不同类型的抗体-药物复合物。具体地,产生的抗体-药物复合物之一含有可检测标记物,而另一种抗体-药物复合物

不含有可检测标记物。抗体-药物复合物可以,但不必需,在可检测标记物的定量之前从测试样品提取物的剩余部分中分离。不考虑抗体-药物复合物是否从测试样品的剩余部分中分离,然后定量抗体-药物复合物中的可检测标记物的数量。然后,测试样品中药物的浓度可以通过将抗体-药物复合物中可检测标记物的数量与标准曲线比较来确定。标准曲线可以利用已知浓度的药物的连续稀释物,通过质谱法重量分析地产生,和通过本领域已知的其他技术来产生。

[0078] 抗体-药物复合物可以通过抗体结合到固相支持物,例如以上关于夹心分析形式所讨论的固相支持物,然后从与固相支持物的接触中除去测试样品的剩余部分来从测试样品中分离。

[0079] 在反向竞争分析中,固定的免疫抑制剂药物或其类似物可以顺序地或同时地与测试样品或测试样品提取物和至少一种标记的抗体或标记的蛋白质接触。抗体或蛋白质可以用任何适合的可检测标记物,包括以上讨论的那些可检测标记物标记。药物或药物类似物可以结合到固相支持物,例如以上关于夹心分析形式所讨论的固相支持物。

[0080] 固定的药物或药物类似物、测试样品或测试样品提取物和至少一种标记的抗体或标记的蛋白质在类似于上文关于夹心分析形式所讨论的条件下孵育。然后产生两种不同类型的抗体-药物或蛋白质-药物复合物。具体地,产生的抗体-药物(或蛋白质-药物)复合物之一被固定,含有可检测标记物,而另一种抗体-药物(或蛋白质-药物)复合物未被固定,含有可检测标记物。未固定的抗体-药物复合物和测试样品或测试样品提取物的剩余部分通过本领域已知的技术,例如洗涤,从固定的抗体-药物复合物的存在中除去。一旦未固定的抗体-药物复合物被除去,则定量固定的抗体-药物复合物中可检测标记物的数量。然后,测试样品中药物的浓度可以通过将抗体-药物复合物中可检测标记物的数量与标准曲线比较来确定。标准曲线可以利用已知浓度的药物的连续稀释物,通过质谱法重量分析地产生,和通过本领域已知的其他技术来产生。

[0081] 在荧光偏振分析中,在一个实施方式中,抗体或其功能活性片段首先与含有免疫抑制剂药物的未标记的测试样品接触来形成未标记的抗体-药物复合物。未标记的抗体-药物复合物然后与荧光标记的药物或其类似物接触。标记的药物或药物类似物与测试样品中任何未标记的药物竞争对抗体或其功能活性片段的结合。测定形成的标记的抗体-药物复合物的数量,测试样品中药物的数量通过使用标准曲线来确定。

[0082] 在本发明的进一步的方面,公开了检测测试样品中免疫抑制剂药物的浓度水平的方法,包括步骤:(a) 将包含 DMSO、至少一种二价金属盐和水的提取试剂组合物与所述测试样品组合来形成测试样品提取物;(b) 将能够结合免疫抑制剂药物的至少一种抗体或蛋白质与所述测试样品提取物组合来形成混合物;(c) 在适合于所述抗体和如果有的话、存在于样品中并与所述抗体为免疫反应性的所述免疫抑制剂药物之间形成复合物的条件下孵育所述混合物;和(d) 检测形成的任何抗体-免疫抑制剂药物复合物的存在。

[0083] IV. 其他免疫抑制剂分析

[0084] 免疫抑制剂浓度的任何其他可选择的测量方法也可以与本发明的提取试剂组合物一起使用。例如,药物含量可以通过基于质谱的方法来测定,例如,在 N. Brown et al., " Low Hematocrit and Serum Albumin Concentrations Underlie the Overestimation of Tacrolimus Concentrations by Microparticle Enzyme

Immunoassay versus Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry", *Clinical Chemistry*. 2005 ;51 :586-592 中描述的快速液相色谱 - 串联质谱技术。

#### [0085] V. 装置

[0086] 任何适合的装置或自动装置可以用于进行提取试剂组合物与血液样品的接触和进行药物浓度水平分析。优选的是以自动化方式进行分析,例如,在 ARCHITECT® (Abbott Laboratories, Abbott Park, Ill 的注册商标) 系统上,其使用了夹心杂交和竞争免疫分析的化学发光检测。分析也可以以小型化形式进行,例如在芯片上实验室设备和系统中进行。

#### [0087] VI. 免疫分析试剂盒

[0088] 在另一个方面,本发明包括免疫分析试剂盒,用于具有与西罗莫司或者环孢霉素相同或相似化学结构,优选的选自西罗莫司、他克莫司、依维莫司、zotarolimus、环孢霉素和其类似物构成的组的免疫抑制剂药物的检测,所述试剂盒包含本发明的提取试剂组合物。这些试剂盒还可以包括对进行夹心免疫分析有用的抗体捕获试剂或抗体指示物试剂。本发明的优选的试剂盒包含容器,其分别含有能够特异性结合至少一种免疫抑制剂药物的至少一种抗体或蛋白质,所述免疫抑制剂药物选自西罗莫司、他克莫司、依维莫司、zotarolimus 和环孢霉素构成的组;提取试剂组合物,其包含按照体积的提取试剂组合物的 50% 的 DMSO,按照体积的提取试剂组合物的 30% -33% 的 EG、PG 或其混合物,水和至少 5mM 浓度的硫酸锌;以及包含至少一种免疫抑制剂药物的对照组合物,所述免疫抑制剂药物选自西罗莫司、他克莫司、依维莫司、zotarolimus、环孢霉素或其类似物构成的组。

[0089] 用于特定的免疫抑制剂药物分析的任何适合的对照组合物可以被包括在本发明的试剂盒中。对照组合物一般包含要被分析的实际的免疫抑制剂以及任何期望的添加剂。例如,他克莫司的对照组合物可以是在美国专利 5, 338, 684, Grenier et al 中描述的对照组合物。

[0090] 根据本发明的试剂盒可以包括固相和固定到所述固相上、或在分析期间变为固相固定的捕获试剂。在示范性的实施方式中,固相包括一种或更多种微粒或电极。当这样的试剂盒被采用用于进行夹心免疫分析时,试剂盒可以另外包括标记的检测试剂。在某些实施方式中,测试试剂盒包括至少一种直接标记物,例如,吡啶鎓-9- 氨基甲酰。根据本发明的测试试剂盒也可以包括至少一种间接标记物。如果采用的标记物一般需要指示物试剂来产生可检测信号,测试试剂盒优选的包括一种或更多种适合的指示物试剂。

[0091] 根据本发明的测试试剂盒优选地包括用于进行本发明的一种或更多种免疫分析的说明书。在本发明的试剂盒中包括的说明书可以固定到包装材料上,或可以作为包装插页来包括。虽然所述说明书一般地为手写的或印刷的材料,它们并不局限于此。能够存储这种说明书和将它们传达到终端用户的任何媒介都是本发明预期的。这种媒介包括、但不限于电子存储媒介(例如,磁盘、磁带、盒式磁带、芯片)、光学媒介(例如,CD ROM)等等。如在此使用的,术语“说明书”可以包括提供所述说明书的互联网站的地址。

[0092] 当然,不言而喻的是,此处的任何示范性的形式,根据本发明的的任何分析或试剂盒可以被修改或优化用于自动化的和半自动化的系统(包括,其中存在包含微粒的固相的那些),例如,在美国专利 NO. 5, 089, 424 和 5, 006, 309 中描述的,以及由 Abbott 实验室 (Abbott Park, IL) 商业销售的,包括但不限于 Abbott 实验室的 ARCHITECT®、AxSYM®、IMX®、ABBOTT PRISM®和 Quantum II 平台,以及其他平台。

[0093] 另外,本发明的分析和试剂盒任选地可以被修改和优化用于 Point of Care 分析系统,包括 Abbott 实验室的 Point of Care (i-STAT®) 电化学免疫分析系统。描述了免疫传感器和在单用途测试设备中制造和操作它们的方法,例如,在美国专利 5,063,081 和公开的美国专利申请 20030170881、20040018577、20050054078 和 20060160164 中(它们的关于这一点的教导通过引用合并)。

## 实施例

[0094] 提供以下实施例来说明,而不是限制要求权利的发明。

### [0095] 实施例 1

[0096] 这个实施例说明了使用 DMSO 与硫酸锌组合来从血液样品中的结合蛋白提取西罗莫司。提取的西罗莫司用免疫分析来测量。

[0097] 以 86% DMSO、14% 水和 40mM 硫酸锌的终浓度制备提取试剂组合物。血液西罗莫司样品的提取通过混合 100  $\mu$ L 血液样品和 200  $\mu$ L 试剂组合物,并大力旋涡 5-10 秒来完成。产生的悬浮液在 13,000rpm 离心 5 分钟来团化沉淀物,如下分析上清液提取物的西罗莫司。在自动化的 ARCHITECT® i2000® 分析仪 (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois) 上通过以下进行分析:

[0098] 1. 混合 10-40  $\mu$ L 的样品提取物和 50  $\mu$ L 的用山羊抗小鼠抗体(来自 Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) 和小鼠抗西罗莫司抗体(如下所述制备的) 包被的微粒。

[0099] 2. 在 33-38°C 孵育反应混合物大约 18 分钟。在样品中的西罗莫司结合微粒上的抗西罗莫司抗体。

[0100] 3. 将 20  $\mu$ L 的吖啶鎓-西罗莫司轭合物添加到反应混合物中。

[0101] 4. 在 33-38°C 孵育反应混合物大约 4 分钟。吖啶鎓-西罗莫司轭合物结合游离的抗西罗莫司结合位点。

[0102] 5. 用磷酸盐缓冲液洗涤微粒。

[0103] 6. 添加 Pre-trigger(酸性溶液) 和 Trigger(碱性溶液) 来使捕获的吖啶鎓-西罗莫司标记物发光,其通过仪器来测量。

[0104] 西罗莫司结合抗体如下产生:雌性 Rbf//Dnj 小鼠施用 3 个每月一次的西罗莫司-27-CMO-破伤风类毒素免疫原的强化,然后在第四个月用西罗莫司-42-HS-破伤风类毒素制品免疫。七个月后,通过在融合之前 3 天使用西罗莫司-27-CMO-破伤风类毒素免疫原,脾内的融合前强化被施用给动物。分离脾脏 B 细胞,在与 SP2/O 骨髓瘤的标准 PEG 融合中使用。汇合培养物在 10-14 天后在微量滴定 EIA 中筛选抗西罗莫司活性,阳性培养物利用限制稀释克隆技术来克隆。分离的克隆在 IMDM w/FBS (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) 组织培养基中扩大,分泌的抗体利用蛋白 A 来亲和纯化。

[0105] 反应曲线数据在表 1 和附图 1 中示出,展现了使用 DMSO/硫酸锌组合物从结合蛋白释放了西罗莫司。

[0106] 表 1

[0107]

西罗莫司 (ng/mL)	RLUs
0	573660
3	474794
6	387857
12	279516
20	191208
30	131426

[0108] 表 1 中的信号测量是按照 RLU<sub>s</sub> (相对光单位)。RLU 是在 ARCHITECT<sup>®</sup> 系统上使用的光学测量单位的名称。ARCHITECT 光学器件系统基本上是光电倍增管 (PMT), 其对化学发光反应发射的光进行光子计数。化学发光反应产生的光的数量与反应混合物中存在的吡啶鎓示踪物的数量成比例, 从而容许患者样品被分析物的定量, 其在化学发光反应发生时也与反应混合物中保留的吡啶鎓的数量成比例。

[0109] 术语相对光单位来自光子计数与一定数量的吡啶鎓的关系。每个光学器件模块用一组吡啶鎓标准物校准。当化学发光反应发生时, 光被发射, 光子在 3 秒的时间中测量。PMT 将计数的光子转化成数字信号, 其然后发送到电路板用于处理。光学器件电路板将来自 PMT 的数字信号转化成模拟信号, 所述模拟信号与计数的光子成比例, 其转而与存在的吡啶鎓的数量成比例。这些模拟信号然后进一步加工来产生 RLU 值。建立这种关系来产生用于光学器件模块的校准的标准, 其中不同的吡啶鎓标准物具有分配给它们的 RLU 值。从而, 当 RLU 单位本身是任意的时, 它与一定量的吡啶鎓成比例 (即, 相对的)。

### [0110] 实施例 2

[0111] 这个实施例说明了组合物中改变的锌的浓度的效用。

[0112] 在 90% DMSO 和 10% 水中以改变的硫酸锌终浓度 (0、10、20、40 和 80mM) 制备组合物。血液西罗莫司样品的提取通过混合 400  $\mu$ L 的血液样品和 800  $\mu$ L 的组合物, 大力旋涡 5-10 秒来完成。产生的悬浮液在 13,000rpm 离心 5 分钟来团化沉淀物, 分析上清液的血西罗莫司。如实施例 1 进行西罗莫司分析。测试数据在表 2 和附图 2 中示出, 说明了从结合蛋白的西罗莫司释放通过添加锌盐被改善。申请人还测试和确定了氯化锌、硝酸锌和醋酸锌也是有效的。

[0113] 表 2

[0114]

西罗莫司 (ng/mL)	RLU				
	没有 Zn	10 mM Zn	20 mM Zn	40 mM Zn	80 mM Zn
0	477005	509875	503822	517429	532760
3	464256	461998	435120	403487	414074
30	367821	214924	161065	99300	100777

### [0115] 实施例 3

[0116] 这个实施例说明了组合物中不同的二价阳离子的效用。

[0117] 如下表中所示的在不同终浓度的金属盐 (硫酸锌、硫酸镉、硫酸铜、硫酸锡、硫酸锰) 和 DMSO 下制备提取组合物 (剩余体积为水)。血液西罗莫司样品的提取通过混合 200  $\mu$ L 的血液样品和 400  $\mu$ L 的组合物, 大力旋涡 5-10 秒来完成。产生的悬浮液在 13,000rpm 离心 5 分钟来团化沉淀物, 分析上清液的血西罗莫司。如实施例 1 进行西罗莫司分

析。实施例数据在表 3 中示出,展现了锌以外的金属盐也可以使用。

[0118] 表 3

[0119]

DMSO	90%	90%	50%	90%	90%
金属盐	40mM Zn	50mM Cd	50mM Cu	20mM Sn	20mM Mn
西罗莫司 (ng/mL)	RLUs	RLUs	RLUs	RLUs	RLUs1
0	550492	536394	523472	517375	524178
3	441164	413887	430245	475927	469885
30	107957	89515	126515	222690	220562

[0120] 实施例 4

[0121] 这个实施例说明了在提取试剂组合中变化的 DMSO 和 EG 比例的效用。

[0122] 在 DMSO 和乙二醇的不同终浓度比例下制备组合物 (DMSO 百分比和乙二醇百分比分别是 80 : 18, 75 : 23, 70 : 28, 65 : 33 和 60 : 33)。所有组合物具有 2% 的水和 40mM 硫酸锌。血液西罗莫司样品的提取通过混合 150  $\mu$  L 的血液样品和 300  $\mu$  L 的组合物,大力旋涡 5-10 秒来完成。产生的悬浮液在 13,000rpm 离心 5 分钟来团化沉淀物,分析上清液的血西罗莫司。如实施例 1 进行西罗莫司分析。实施例数据在表 4 和附图 3 中示出,展现了当 DMSO 的浓度降低时,如果乙二醇浓度提高,可以维持足够的变性能力。

[0123] 表 4

西罗莫司 (ng/mL)	变化的DMSO: EG比例的RLUs				
	80:18	75:23	70:28	65:33	60:38
0	457694	454223	428721	450344	446482
3	340579	346026	330247	364041	363857
30	70582	78831	72669	95479	94442

[0125] 在单独使用时完全无效或仅或多或少地有效的 DMSO 或乙二醇的浓度 (例如, 65% DMSO 或 33% 乙二醇), 在组合中是高度有效的。丙二醇可以替代 DMSO : 乙二醇混合物中的乙二醇 (数据未显示)。DMSO : 乙二醇混合物具有提高硫酸锌的溶解度的另外的优点。

[0126] 实施例 5

[0127] 这个实施例说明了通过加热提取混合物实现的西罗莫司提取效率的改进。

[0128] 以 70% DMSO、28% 乙二醇、2% 水和 46mM 硫酸锌的终浓度制备基于 DMSO 的组合物。血液西罗莫司样品的提取通过混合 150  $\mu$  L 的血液样品和 300  $\mu$  L 的组合物,大力旋涡 5-10 秒,并在不同的温度下孵育 15 分钟来完成。产生的悬浮液在 13,000rpm 离心 5 分钟来团化沉淀物,分析上清液的血西罗莫司。如实施例 1 进行西罗莫司分析。

[0129] 实施例数据在表 5 和附图 4 中示出,展现了当提取混合物被加热时更有效的西罗莫司释放 (即,在 0ng/mL 校准物和 3ng/mL 校准物之间的差异随着提高温度而提高)。

[0130] 表 5

		作为温度的函数的RLUs				
		30 C	35 C	40 C	45 C	50 C
[0131]	0 ng/mL 西罗莫司	397353	395993	396009	395694	395957
	3 ng/mL 西罗莫司	281375	273856	264768	256660	254426

[0132] 实施例 6

[0133] 这个实施例说明了基于 DMSO 的提取组合物与典型的基于甲醇的提取组合物相比的最小的蒸发。

[0134] 以 70% DMSO、28% 乙二醇、2% 水和 46mM 硫酸锌的终浓度制备基于 DMSO 的组合物。以 80% 甲醇、18% 乙二醇、2% 水和 50mM 硫酸锌的终浓度制备基于甲醇的组合物。使用任一种组合物的血液西罗莫司样品的提取通过混合 125  $\mu$ L 的血液样品和 250  $\mu$ L 的组合物,大力旋涡 5-10 秒来完成。基于 DMSO 的组合物提取混合物在 42°C 孵育 10 分钟,基于甲醇的组合物提取混合物在室温下孵育 10 分钟。提取混合物在 13,000rpm 离心 5 分钟来团化沉淀物,将上清液倒出到 ARCHITECT® i2000® 分析仪中使用的样品杯中。立即地(零时间)和在倒入样品杯之后 1、2 和 3 小时测试一组样品的蒸发(样品容许保持在室温,大约 22°C)。测试数据在表 6 和附图 5 中示出,说明了基于甲醇的组合物的快速蒸发,其表现为更高的西罗莫司浓度。在低于 2 小时内,使用基于甲醇的组合物,西罗莫司浓度中的误差超过 10%,但用 DMSO 组合物在浓度中基本上没有发生改变。如果湿度更低,或如果孵育温度更高,西罗莫司浓度中的误差将更大(某些免疫化学分析分析仪在接近 37°C 的温度孵育样品)。

[0135] 表 6

		西罗莫司 (ng/mL)	
小时	DMSO	MeOH	
[0136]	0	11.47	11.14
	1	11.37	12.47
	2	11.18	12.88
	3	11.50	13.83

[0137] 以上描述的示范性的实施方式意图在本发明的所有方面中是说明性的,而不是限制性的。因而,本发明能够在本领域的技术人员可以从此处的描述得出的许多变化和修改中实现。所有这样的变化和修改被认为处在由以下权利要求所定义的本发明的范围和精神中。

[0138] 此外,在 2006 年 12 月 29 日提交的、共有的共同待决申请美国临时申请系列号 60/882,732,对于它关于检测全血中分子或药物的诊断测试的教导,通过完全引用明确地并入。

[0139] 2006 年 12 月 29 日提交的,共有的共同待决申请美国临时申请系列号 60/878,017,对于它关于用于溶液中捕获的免疫分析的非变性裂解试剂的教导,通过完全引用明确地并入。

[0140] 2006 年 12 月 29 日提交的,共有的共同待决申请美国非临时申请系列号 11/618,495,对于它关于非变性裂解试剂的教导,通过完全引用明确地并入。

[0141] 2006 年 7 月 21 日提交的、共有的共同待决申请美国非临时申请系列号 11/490,624,对于它关于提取试剂组合物的教导,通过完全引用明确地并入。

[0142] 2006 年 12 月 29 日提交的、共有的共同待决申请美国临时申请系列号

60/882, 863, 对于它关于免疫抑制剂药物的改进的分析的教导, 通过完全引用明确地并入。

[0143] 此外, 在此引用的所有其它出版物、专利和专利申请为了所有目的、通过以它们  
的整体引用而由此并入。

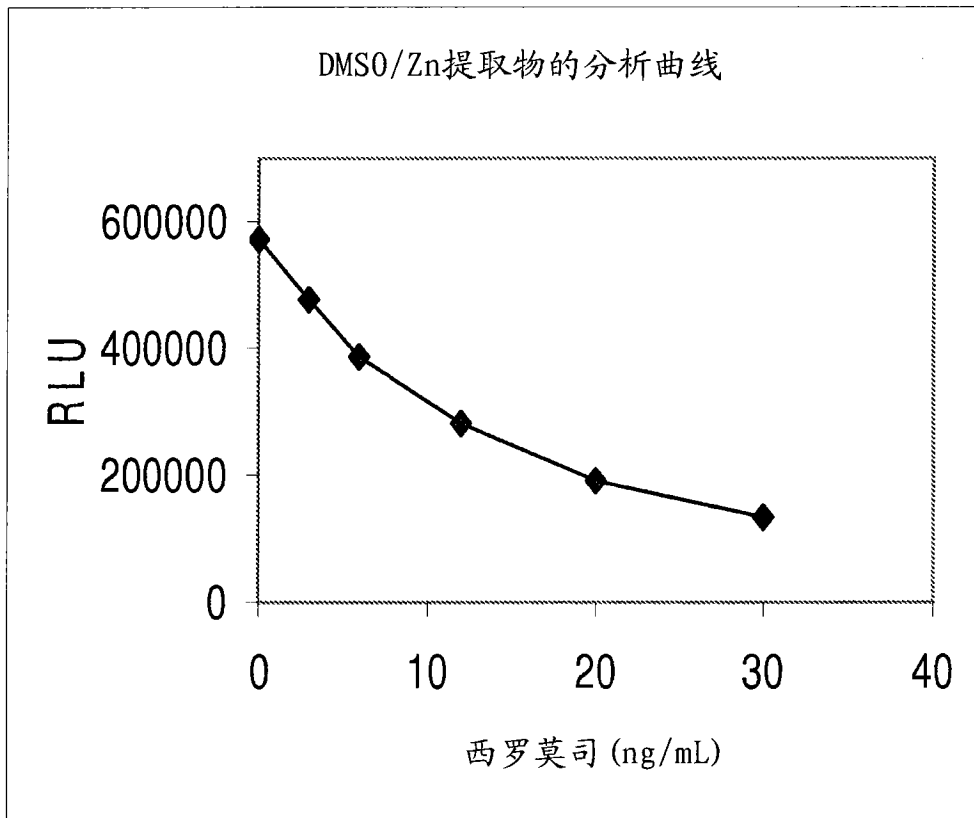


图 1

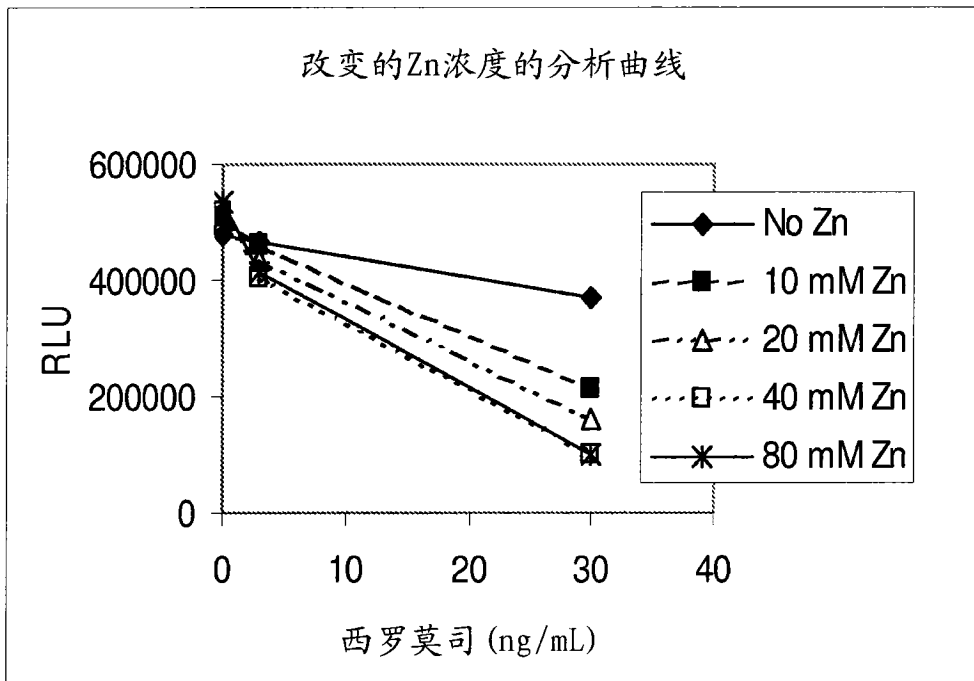


图 2

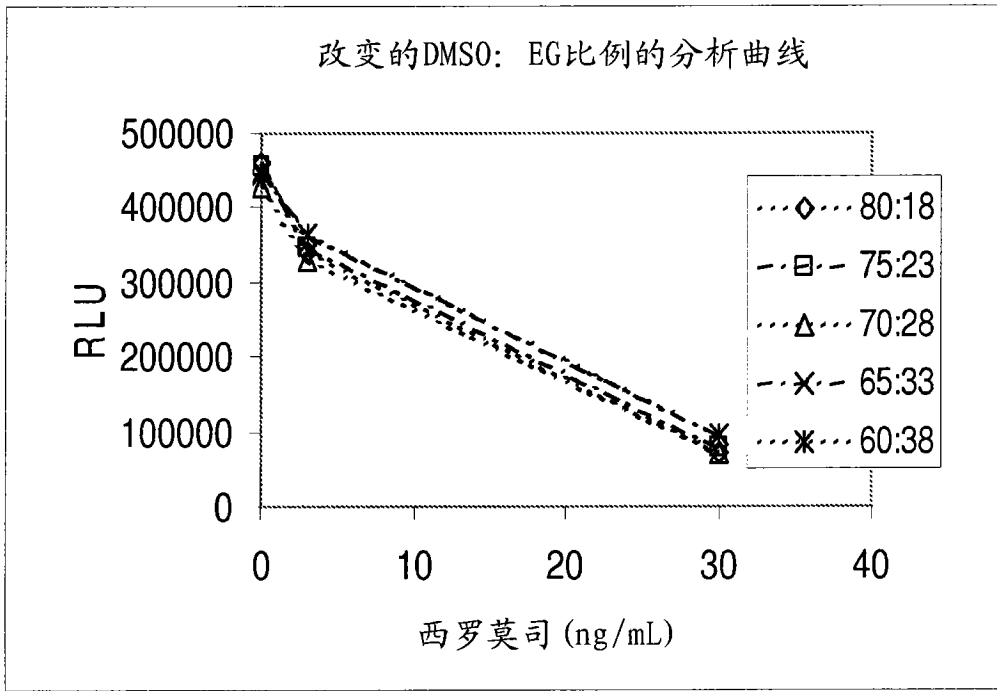


图 3

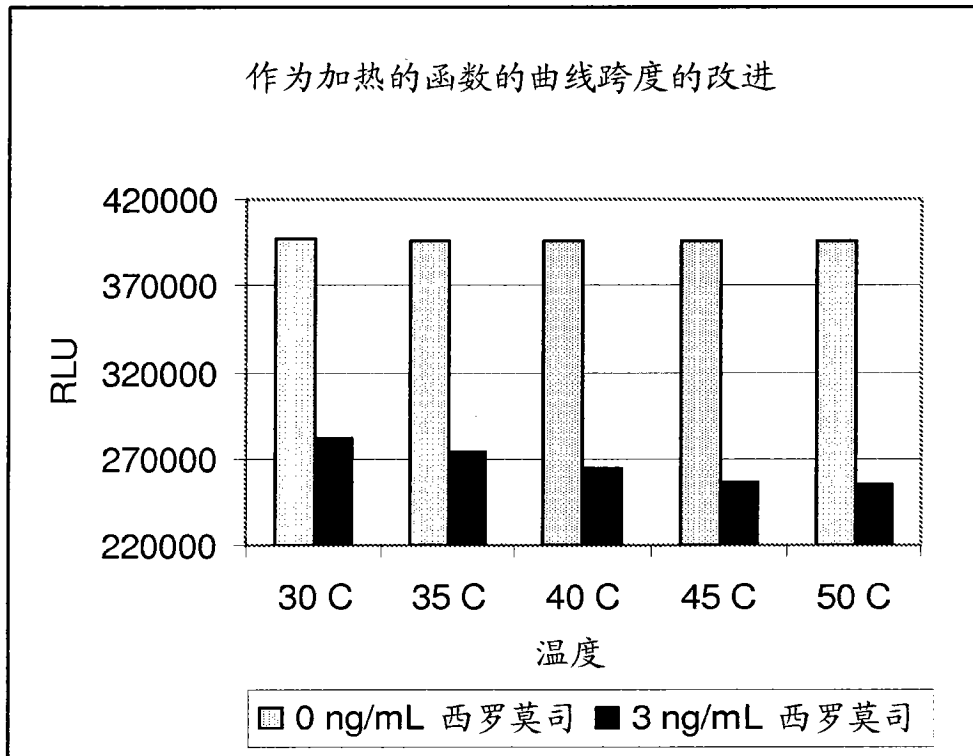


图 4

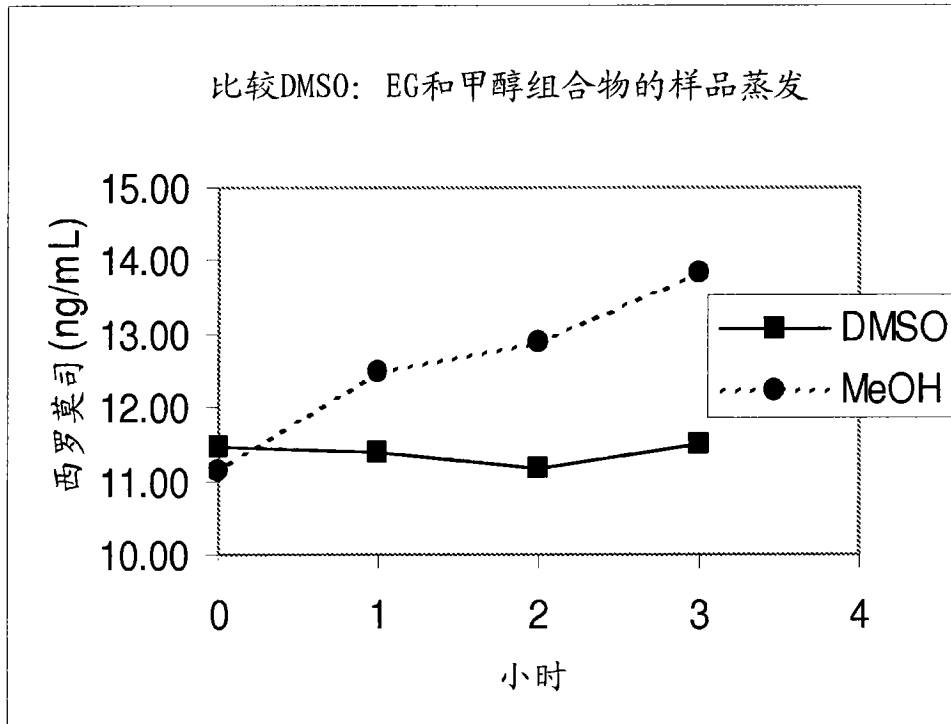


图 5

专利名称(译)	用于免疫分析的免疫抑制剂药物提取试剂		
公开(公告)号	<a href="#">CN101946179B</a>	公开(公告)日	2014-08-13
申请号	CN200780102326.3	申请日	2007-12-19
[标]申请(专利权)人(译)	雅培公司		
申请(专利权)人(译)	雅培制药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	雅培制药有限公司		
[标]发明人	FC格勒尼耶 RF沃克曼 HN赛德 S阿利		
发明人	F·C·格勒尼耶 R·F·沃克曼 H·N·赛德 S·阿利		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/9493		
代理人(译)	郭文洁		
审查员(译)	胡晓佳		
其他公开文献	CN101946179A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种用于从血液样品提取免疫抑制剂药物，例如西罗莫司、他克莫司或环孢霉素，而产生具有低蒸气压和与免疫分析成分相容的测试样品提取物，的改进的提取试剂组合物和方法。本发明的试剂组合物包含二甲亚砜(DMSO)，至少一种二价金属盐和水。这些组合的每一种的使用所产生的样品提取物具有低蒸气压，并且与免疫化学分析是相容的。

